

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Laura Truu

***Wfs1* ja *Grp94* ekspressiooni sõltuvus glükoosi tasemest ja NMDA
retseptori inhibeerimisest hiire (*Mus musculus*) hipokampuses**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MSc. Triin Tekko

PhD. Kersti Lilleväli

TARTU 2013

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1. <i>Wfs1</i> geen ja Wolframi sündroom	7
1.2. <i>Wfs1</i> ja glükoosi taseme regulatsioon	8
1.3. Glükoosi reguleeritud valgud (<i>Grp78</i> ja <i>Grp94</i>)	10
1.4. NMDA retseptor, selle seos <i>Wfs1</i> -ga interakteeruvate valkude ja ER stressiga	13
2. Eksperimentaalsed	15
2.1. Töö eesmärgid	15
2.2. Materjal ja meetodika	15
2.2.1. Töös kasutatud hiirelinn	15
2.2.2. Proovi süntees	15
2.2.3. Organotüüpiliste hipokampuse lõikude kasvatamine	15
2.2.4. <i>Whole-mount</i> RNA <i>in situ</i> hübridisatsioon kultuuris kasvanud hipokampuse lõikudele	16
2.2.4.1. Fikseerimine	16
2.2.5. Immunohistokeemia ja hübridisatsioonijärgsed pesud	17
2.2.6. Värvusreaktsioon	17
2.2.7. Mikroskoopia	17
2.2.8. Analüüs	18
2.3. Tulemused	18
2.4. Arutelu	22
Kokkuvõte	26
Summary	28
Tänuavaldused	30

Kirjanduse loetelu	31
Lihtlitsents	40

Kasutatud lühendid

AC1	Adenüülüütsüklaas 1 (<i>adenylyl cyclase 1</i>)
AC8	Adenüülüütsüklaas 8 (<i>adenylyl cyclase 8</i>)
AKAP79/150	(<i>A-kinase anchor protein 5</i>); ankurvalk
AMPA	α -amino-3-hüdroksüül-5-metüül-4-isoksasool-propionaat (<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>); retseptori agonist
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APV	(<i>2R</i>)-amino-5-phosphonovaleric acid; NMDA retseptori antagonist
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i> ; transkriptsioonifaktor
CA1	Hipokampuse <i>cornu ammonis 1</i> piirkond
cAMP	Tsükliline adenosiinmonofosfaat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
DIDMOAD	Wolframi sündroom (<i>Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, Deafness</i>)
ERSE	ER-i vastuse element (<i>ER stress response element</i>)
GIP	Glükoos-sõltuv insulintroopne polüpeptiid (<i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>)
Glp-1	Glükagoonitaolise peptiid-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>)
GLS	Golgi lokalisatsiooni signaal (<i>Golgi localization sequence</i>)
GluR1	Glutamaadi retseptor 1 (<i>glutamate receptor 1</i>); AMPA retseptori subühik 1
Glut4	Glükoosi transporter 4 (<i>glucose transporter type 4</i>)
Grp78 /BiP/HSPA5	Glükoos - reguleeritud valk 78 (<i>glucose-regulated protein 78</i>)
Grp94	Glükoos - reguleeritud valk 94 (<i>glucose-regulated protein 94</i>)
HRD1	E3 ubikvitiini ligaas

HSP70	Kuumašoki valk 70 (<i>heat shock protein 70</i>)
IGF-I; IGF-II	Insuliinisarnased kasvufaktorid
LTD	Pikaajaline sünaptilise signaaliülekanne pärssimine (<i>long term depression</i>)
LTP	Sünapsi pikaajaline erutuvus (<i>long term potentiation</i>)
mGluR	Metabotroopsed glutamaadi retseptorid (<i>metabotropic glutamate receptor</i>)
NMDA	N-metüül-D-aspartaat (<i>N-methyl-D-aspartate</i>); retseptori agonist
NMDAR	NMDA retseptor
PKA	Proteiinkinaas A (<i>protein kinase A</i>)
UPR	<i>Unfolded protein response</i> , ER stressi vastus
Wfs1	<i>Wolfram syndrome 1</i> ; Wolframi sündroomi 1 valk hiirel
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i> ; transkriptsioonifaktor

Sissejuhatus

Geenide ekspressioon on sageli mõjutatav väliskeskkonnast tulevatest signaalidest, mis võivad geenidele avaldada mõju nii eraldi kui ka mitme faktorina koos. Mutatsioonid inimese *WFS1* geenis põhjustavad haruldast neurodegeneratiivset autosomaalset retsessiivset haigust, nimega Wolframi sündroom. Selle haiguse sümptomiteks on magediabeet (*diabetes insipidus*), insuliini-puudulik suhkurtõbi (*insulin deficient diabetes mellitus*), nägemisnärvi atroofia (*optic atrophy*) ja kurtus (*deafness*) (Swift jt, 1990). *Wfs1* ekspresseerub rohkelt südames, ajus, platsentas, kopsudes ja pankreases (Inoue jt, 1998). *Wfs1*-l on füsioloogilisi funktsioone membraani *trafficking*-s, sekretsioonis, valkude protsessingus, ER kaltsiumi homöostaasi ja ER stressi vastuse (UPR e *unfolded protein response*) regulatsioonis (Yamaguchi jt, 2004; Yamada jt, 2006; Zatyka jt, 2008). *Wfs1* funktsiooni on intensiivselt uuritud pankrease β -rakkudes, kuid neuronites on *Wfs1* funktsioon veel segane.

Käesolevas bakalaureusetöös annan ülevaate *Wfs1*-st, selle rollist ER stressi ja glükoosi taseme regulatsioonis, võimalikest interaktsioonidest Grp78 ja Grp94-ga ning NMDA retseptoriga. Eksperimentaalselt vaatan glükoosi ja NMDA retseptori inhibeerimise mõju *Wfs1* ja *Grp94* ekspressioonile hiire hipokampuses ja meie lõigukultuuri mudeli sobivust geeniekspressiooni uurimisel. Katsed viidi läbi Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia, farmakoloogia ja füsioloogia instituutides.

Töö eesmärgid on:

- 1) anda ülevaade *Wfs1*-st, sellega seonduvast valgust Grp94-st ja NMDA retseptori kaudu toimuvast signaaliülekandest,
- 2) hinnata hipokampuse lõigukultuuri mudeli sobivust *in situ* hübridisatsiooniga geeniekspressiooni uurimiseks,
- 3) uurida glükoosi ja NMDA retseptori inhibeerimise mõju *Wfs1* ja *Grp94* ekspressioonidele.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. *Wfs1* geen ja Wolframi sündroom

1938. aastal kirjeldasid dr Donald Justin Wolfram ja H.P.Wagener kaheksa sugulase (vanuses 3–18 aastat) fenotüüpe, kelle seast neljal oli noorte diabeet ja nägemisnärv atroofia (Wolfram ja Wagener, 1938). See oli esimene raporteeritud Wolframi sündroomi haigusjuhtum. Sündroomi esialgsest kirjeldamisest alates on tuvastatud rohkem kui 200 haigusjuhtumit. Tuvastatud on algsetele sümptomitele lisaks veel magediabeet, neeruhaired, neuroloogilised ning endokriinsed ebanormaalsused (Swift jt, 1990).

Wolframi sündroom on haruldane neurodegeneratiivne autosomaalne retsessiivne haigus. Wolframi sündroomi kutsutakse ka nimega DIDMOAD, mis on tuletatud haiguse sümptomitest magediabeet (*diabetes insipidus*), insuliini-puudulik suhkurtõbi (*insulin deficient diabetes mellitus*), nägemisnärv atroofia (*optic atrophy*) ja kurtus (*deafness*) (Wolfram ja Wagener, 1938; Swift jt, 1990).

Wfs1 geen, mis on Wolframi sündroomi puhul muteerunud, paikneb inimesel neljanda kromosoomi 16,1 piirkonnas (4p16.1) ja koosneb kaheksast eksonist (Hofmann jt., 2003). *Wfs1*-l on promootoris ER stressi vastuse elemendi (ERSE) sarnane järjestus. *Wfs1* geeni produkt on 890 aminohappe pikkune 100 kDa molekulmassiga endoplasmaatilise retiikulumi (ER) membraanis paiknev glükoproteiin nimega volframiin. Volframiin on hüdrofoobne, tetrameerne valk, millel on üheksa transmembraanset segmenti ja suur hüdrofiilne regioon mõlemas terminuses (Hofmann jt, 2003).

Wfs1 ekspresseerub rohkelt südames, ajus, platsentas, kopsudes ja pankreases (Inoue jt, 1998). Hiire ajus ekspresseerub *Wfs1* geen ajukoores, juttkehas, *nucleus accumbens*-is, hüpotaalamuses, taalamuse retikulaartuumas, ajutüve motoorsetes ja sensoorsetes tuumades, hipokampuse CA1 piirkonnas ning amügdalas (Takeda jt, 2001; Ishihara jt, 2004; Kato jt, 2008; Kawano jt, 2008; Luuk jt, 2008)

Wfs1 puudulikkus põhjustab nii inimestel kui ka hiirtel β -rakkude kaotust, mis omakorda aitab kaasa II tüüpi diabeedi kujunemisele (Hofmann jt, 2003; Laybutt jt, 2007). *Wfs1*-l on füsioloogilisi funktsioone membraani *trafficking*-s, sekretsioonis, osade valkude protsessingus, ER kaltsiumi homöostaasi ja ER stressi vastuse (UPR e *unfolded protein response*) regulatsioonis (Yamaguchi jt, 2004; Yamada jt, 2006; Zatyka jt, 2008).

Wfs1 rolli ER stressi ohjamisel on selgitanud Fonseca töögrupp (Fonseca jt, 2010). Kui ER-i funktsioon on häiritud, näiteks pakkimata või valesti pakitud valkude ER-i akumuleerumise tagajärjel, tekib ER stress ja indutseeritakse UPR. Wfs1 reguleerib transkriptsioonifaktorit ATF6 α , mis osaleb ER stressi vastuse rajas. ATF6 α on ER stressi vastuse rajas üks võtmefaktoreid, mis aktiivses olekus aktiveerib transkriptsiooni ER stressi vastuselementi (ERSE) sisaldavatelt promootoritelt. Kui UPR on liigselt aktiveeritud, läheb rakk apoptoosi. Wfs1 stabiliseerib E3 ubikvitiini ligaasi HRD1, toob ATF6 α proteasoomi ning suurendab ubikvitineerimist ja proteasoomi vahendatud degradatsiooni, mis viib ER stressi signaliseerimise pärssimiseni (Fonseca jt, 2010).

Wfs1 on oluline mitmete valkude kokkupakkimise ja posttranslatsioonilise modifitseerimise juures. Üheks *diabetes insipidus*'e põhjuseks Wolframi sündroomi patsientidel peetakse vasopressiini eellasvalgu vigast töötlemist (Gabreels jt, 1998). Na⁺/K⁺ ATPaasi β 1 subühik on kokkupakkimise ajal seotud Wfs1 karboksüterminaalse (C-terminaalse) ER-i luumenis asuva domääniga. Wfs1 puudulikkusel on Na⁺/K⁺ ATPaasi subühikute tase rakumembraanis vähenenud. Na⁺/K⁺ ATPaas tagab rakkude puhkepotentsiaali, pumbates ühe ATP energia arvelt kolm Na⁺ iooni rakust välja ja kaks K⁺ iooni rakku sisse. Ebapiisaval Na⁺/K⁺ ATPaasi hulgal võib olla roll Wolframi sündroomi puhul esineva neurodegeneratsiooni põhjustamises (Zatyka jt, 2008).

1.2. Wfs1 ja glükoosi taseme regulatsioon

Pärast toidu tarbimist tajuvad pankrease β -rakud kõrgeenenud glükoosi ja seedekulgla toodetavate inkretiinhormoonide taset ning vastuseks vabastavad insuliini (Ashcroft ja Rorsman, 2012). Insuliin vastutab glükoosi transpordi eest rakku, mida otseselt reguleerib glükoosi transporter Glut4. Insuliin seondub keharakkude pinnal paiknevate insuliini retseptoritega, mis tõstab Glut4 valkude kontsentratsiooni plasmamembraanis ning sellega omakorda suurendab glükoosi omastamist (Watson jt, 2004; Furtado jt, 2002). Kui insuliini signaali enam ei vajata, lastakse see tagasi ekstratsellulaarsesse keskkonda või lagundatakse endotsütoosi järgselt insuliini proteaasi abil (Duckworth jt, 1998).

Pankrease β -rakkude häiringud on II tüüpi diabeedi arengu aluseks (Fonseca jt, 2012). II tüüpi diabeedi puhul sageli aset leidva pankrease β -rakkude hävingu põhjustamisel mängib olulist rolli ER stress (Laybutt jt, 2007). II tüüpi diabeedi patsientidest isoleeritud pankrease β -

rakkudes on üks ER stressi indutseeriv tegur keskkonna glükoosi taseme tõus (Marchetti jt, 2007).

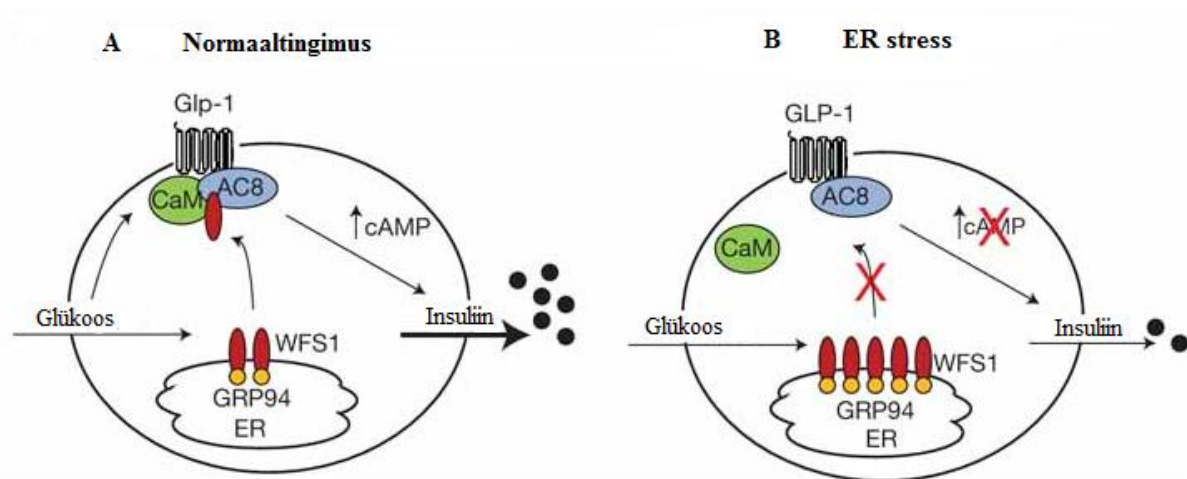
Wfs1 mängib pankrease β -rakkudes rolli nii ER stressi vastuse regulatsioonis kui ka glükoosi poolt stimuleeritud insuliini sünteesi ja sekretsiooni reguleerimisel (Fonseca jt, 2010; Fonseca jt, 2012).

Insuliini vabastamine pankrease β -rakkudest on reguleeritud mitmete mõjutegurite kaudu. Ühest küljest sõltub see mitokondrite tööst põhjustatud tsitraaditsükli vaheproduktide akumulatsioonist ja ATP taseme tõusust, mis viib intratsellulaarse Ca^{2+} taseme tõusu ja insuliini sisaldavate vesiikulite sulandumiseni rakumembraaniga (Jensen jt, 2008). Teiseks insuliini vabastamise regulaatoriks on inkretiinhormoonide, glükagoonitaolise peptiid-1 (Glp-1) ja glükoos-sõltuva insulintroopse polüpeptiidi (GIP) vabastamine seedekulglast. Inkretiinhormoonid võimendavad glükoosist tingitud insuliini sekretsiooni intratsellulaarse tsüklilise AMP (cAMP) taseme tõstmisega (Hansotia ja Drucker, 2005).

Glp-1 ja glükoosi taseme tõusu koosmõju cAMP taseme tõusule vahendab kaltsium-kalmoduliin-sõltuv adenüülütsüklaas 8 (AC8) (Delmeire jt, 2003). Hiljuti näidati, et AC8 moodustab pankrease β -rakkudes glükoosist sõltuvalt kompleksi Wfs1-ga (Fonseca jt, 2012).

Glükoosiga stimuleerimine põhjustab Wfs1 translokatsiooni ER-i membraanist plasmamembraani, kus see seondub kalmoduliini ja AC8-ga. Vastusena glükoosi taseme tõusule ja Glp-1 retseptori aktivatsioonile, toodetakse selles kompleksis cAMP-d, mis suurendab nii insuliini vabastamist kui biosünteesi (Fonseca jt, 2012; vt joonis 1).

Wfs1 moodustab β -rakkudes ja närvirakkudes kompleksi ER-i chaperoniga, glükoos - reguleeritud valguga 94 (Grp94) (Kakiuchi jt, 2009; Fonseca jt, 2012). Tavatingimustel on kompleks tugevasti koos, kuid glükoosiga stimuleerimine nõrgendab Grp94 ja Wfs1 interaktsiooni, mis lubab Wfs1-l lahkuda ER-st. ER stressi ajal moodustub uuesti Grp94 ja Wfs1 kompleks, mis aitab hoida Wfs1 ER-s, et täita selle funktsiooni ER stressi leevendamisel. See aga omakorda viib β -rakkude funktsiooni üldisele vähenemisele (Fonseca jt, 2012).



Joonis 1: Insuliini sekretsiooni ja cAMP-i sünteesi sõltuvus Wfs1-st. Füsioloogilises tingimuses stimuleerivad glükoos ja Glp-1 Wfs1-e translokatsiooni ER-st plasmamembraani, kus Wfs1 moodustab kompleksi AC8 ja kalmoduliiniga (CaM). See stimuleerib cAMP-i sünteesi ja insuliini sekretsiooni (A). ER stressi korral jääb Wfs1 ER-i püsima, takistades AC8 ja kalmoduliiniga kompleksi moodustumist, mis inhibeerib cAMP sünteesi ja insuliini sekretsiooni (B) (Fonseca jt, 2012).

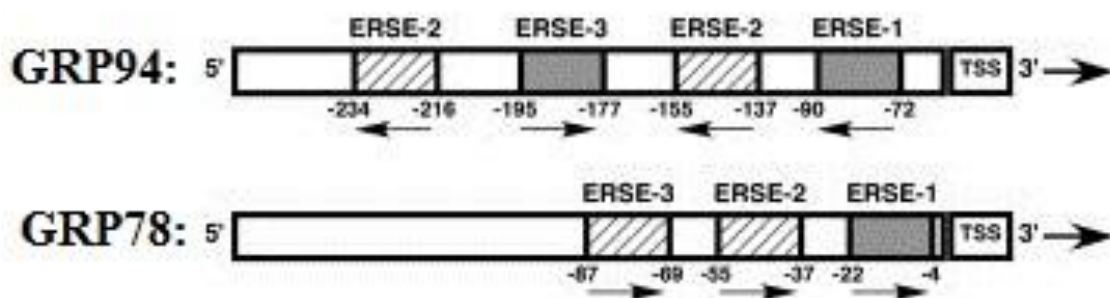
1.3. Glükoosi reguleeritud valgud (Grp78 ja Grp94)

Glükoosi reguleeritud valgud (Grp e *glucose regulated protein*) on ER-i lumenis paiknevad Ca^{2+} -seostuvad chaperonid, mis annavad rakule kaitsemehhanismi, et tulla toime ER stressiga, kui rakku on kogunenud valesti pakitud või pakkimata jäänud valke (Lee, 2001). Grp geenid on pidevalt ekspresseeritud, kuid nende promootorite aktiivsust saab suurendada rakukultuuris madala glükoosi või hapniku kontsentratsiooniga ja ER stressi indutseerivate farmakonidega (Lee, 1992).

Grp valke ekspresseeritakse kõikides rakkudes ja nende transkriptsiooni indutseeritakse vastuseks erinevatele ER normaalset funktsiooni segavatele faktoritele. Nendeks stressi tekitavateks faktoriteks on näiteks kaltsiumi vähenemine ER-i lumenis, asparagiini N-seoselise glükosülatsiooni inhibitsioon, disulfiidsildade vähenemine, mutantsete valkude või valkude subühikute süntees, väga intensiivne valgusüntees. Valkude kuhjumisest annab märku pakkimata valkude vastus (UPR), mis selektiivselt käivitab Grp-sid kodeerivate geenide transkriptsiooni. ER stressi kõrvaldamisel modifitseeritakse Grp-d post-transkriptsiooniliselt inaktiivsesse vormi (Kozutsumi jt, 1988).

Uurituimad Grp-d on Grp78 ja Grp94. Grp78 (kutsutakse ka nimedega HSPA₅ ja BiP) on 78 kDa suurune HSP70 perekonda kuuluv valk, mis blokeerib ER-stressi signaale, säilitab ER

funktsiooni, tagades valkude voltumise, reguleerib kaltsiumi homöostaasi ja kaitseb rakke valesti voltunud valkude toksilisuse eest (Kaufman, 1999; Lee 2005). Grp78 koosneb kolmest domäänist: ATPaasi domään, peptiidiga seonduv domään ja C-terminaalne domään (King jt, 2001). *Grp78* promootoril on tugev aktiivsus diferentseerunud ja mitte diferentseerunud kudedes, mis teeb sellest hea promootori viiruslike promootorite asemel geeniteraapias (Little jt, 1994). Kõik *Grp* promootorid koosnevad mitmetest kõrgelt konserveerunud ERSE koopiatest (CCAAT(N)₉CCACG) (vt joonis 2). ER stressi korral seondub ATF6 ERSE järjestusega, mille abil saab toimuda Grp-de transkriptsiooniline induktioon (Yoshida jt, 1998). On leitud, et Grp78-l esineb suur tähtsus embrüonaalses arengus. Grp78 *knockout* hiirte embrüotes on rakkude jagunemine aeglustunud ja paljud sisemise rakkude massi rakud lähevad apoptoosi, embrüod surevad 3,5 päeva vanuselt (Luo jt, 2006).



Joonis 2: Inimese ER-i chaperonide *GRP94* ja *GRP78* promootorite võrdlus. Alumised numbrid näitavad kaugust transkriptsiooni alguspunktist (TSS). Tumedad kastid näitavad ER chaperonide vahel homoloogseid ERSE järjestusi, viirutatud kastid näitavad mitte täielikult homoloogseid ERSE järjestusi. *GRP94*-l on neli ERSE-t, millest kaks on homoloogsed, *GRP78*-l on kolm ERSE-t, millest üks on homoloogne (Marzec jt, 2012).

ER stressi korral seondub Grp78 valesti pakitud valkudega ning kaitseb neid agregaatide moodustumise ja edasi pakkimise eest. See protsess vabastab Grp78 küljest ATF6, mis paljastab Golgi lokalisatsiooni signaali (GLS). Seejärel transporditakse ATF6 Golgi kompleksi, kus see muudetakse aktiivsesse vormi. ATF6 aktiivne vorm saab chaperonide promootori ERSE järjestusele seondudes indutseerida ER chaperonide (k.a. Grp78) ekspressiooni, mis omakorda aitab toime tulla ER stressiga. ATF6 reguleerib enamikke ER stressi sihtmärk-geene. ER stressi möödumisel muutub ATF6 Grp78-ga seondumisel inaktiivsesse vormi ja ER chaperonide transkriptsioon väheneb (Shen jt, 2002).

Grp94 on HSP90 sarnane 94 kDa suurune valk ER-i lumenis, mis stabiliseerib sekreteeritavaid ja membraanivalke. Selle funktsioonid on sarnased Grp78 omadega: ER stressi vastuse regulatsioon ning kaltsiumi ja pakitavate valkude sidumine (Lee 1981; Koch jt, 1986; Srivastava 1993). Grp94 osaleb sekreteeritud ja plasmamembraani valkude *trafficking*-s

selektiivselt, kuigi on ekspresseeritud praktiliselt igas rakus ning on üks suurima kontsentratsiooniga ER komponente (Lee, 2001). Grp94 substraatideks on valgud, millel esineb disulfiidsidemeid või asparagiini seoselist glükosüleerimist (Marzec jt, 2012).

Grp94 puudulikud rakud suudavad kasvada normaalselt, kuigi aeglasemalt ja on endiselt võimelised diferentseerumiseks (Randow ja Seed, 2001; Ostrovsky jt, 2009; Wanderling jt, 2007). Hiire areng peatub ilma Grp94-ta embrüonaalse arengu seitsmendal päeval, enne gastrulatsiooni ja mesodermaalse koe moodustumist (Wanderling jt, 2007).

Üks ER-i funktsioone on kaltsiumi hoiustamine. Ca^{2+} säilitatakse seal mitmete valkudega seondumisel, k.a. Grp94-ga. Grp94 on madala afiinsuse ja suure mahutavusega kaltsiumit siduv valk, millel on arvatud olevat 15 kaltsiumi seondumise saiti, millest 4 on keskmise afiinsusega ja 11 madala afiinsusega. Ca^{2+} reguleerib Grp94 aktiivsust (Van jt, 1989). Lisaks hoiustamisele peab Grp94 reguleerima vabade kaltsiumiioonide kõikumist, kuna valkudega seotud Ca^{2+} vabastatakse vastavalt raku füsioloogilistele nõudmistele ja kaltsiumiioonid liiguvad mööda ER kanaleid tsütosooli. Grp94 saab energiat ATP seondumisest ja hüdrolüüsist, mida vajatakse chaperoni aktiivsuseks (Marzec jt, 2012; Ostrovsky jt, 2009).

Füsioloogilistes tingimustes on glükoosi madala kontsentratsiooni korral *Grp94* ekspressioon alla surutud (Spindler jt, 1990). Rakukultuuris on näidatud, et kui algselt hoida glükoosi kontsentratsioon püsivalt stabiilne, on Grp94 kontsentratsioon väga madalal tasemel. Tõstes rakud aga glükoosita söötmele, hakkab Grp94 kiirelt akumuldeeruma (Shiu jt, 1977; Lee jt, 1983).

Võrreldes tsütoplasmas paikneva HSP90-ga, ei ole *Grp94* indutseeritav kõrge temperatuuri või teiste tsütosooli stressidega (Subjeck ja Shyy, 1986). *Grp94* promootori käivitavad UPR-i transkriptsioonifaktorid, näiteks ATF6 ja XBP-1. Transkriptsioonifaktorid peavad promootori aktiveerimiseks olema aktiivses vormis (Lee jt, 2003). Nagu kõikide ER chaperonide promootorites, esineb ka *Grp94* promootoris ERSE järjestusi, mis vahendavad ER stressi vastust. Inimese *Grp94* promootor sisaldab nelja ERSE koopiat (Marzec jt, 2012; vt joonis 2).

Grp94 indutseerimine UPR-i käigus on vajalik teiste UPR-ga seotud valkude õigeks kokkupakkimiseks. ER stressi vastuse käigus aktiveeritakse insuliinisarnaste kasvufaktorite IGF-I ja IGF-II transkriptsioon. IGF-I ja IGF-II signalisatsioon on vajalik erinevate metabolisme stresside talumiseks. Grp94 aitab nende hormoonide õigele voltumisele kaasa ning suurendab selle kaudu rakkude võimekust ER stressiga toime tulla (Ostrovsky jt, 2009; Novosyadlyy jt, 2008).

Üks Grp94 seondumispartnerid on Wfs1 (Kakiuchi jt, 2009; Fonseca jt, 2012). On näidatud, et meeolelu stabilisaator valproaat reguleerib Wfs1 ja Grp94 suhet neuronites, aktiveerides *Wfs1* promootorit ja indutseerides *Wfs1* mRNA sünteesi. Normaalingimustel moodustab Wfs1 Grp94-ga kompleksi, valproaat suurendab kompleksi lagunemist (Kakiuchi jt, 2009).

1.4. NMDA retseptor, selle seos Wfs1-ga interakteeruvate valkude ja ER stressiga

Glutamaat on põhiline erutav neurotransmitter kesknärvisüsteemis, avaldades neuronitele mõju kahte tüüpi retseptorite kaudu. Ioonkanalit moodustavad e ionotroopsed glutamaadi retseptorid jagunevad NMDA, AMPA ja kainaat retseptoriteks. Need retseptorid on nimetatud neid aktiveerivate agonistide järgi: NMDA (N-metüül-D-aspartaat), AMPA (α -amino-3-hüdroksüül-5-metüül-4-isoksasool-propionaat) ja kainaat. Ionotroopsed glutamaadi retseptorid võimaldavad läbipääsu naatriumi- ja kaaliumiioonidele ning osadel juhtudel ka Ca^{2+} väikestele kogustele. Retseptorid on moodustunud valkude subühikutest ja produtseerivad alati eksitatorset postsünaptilist vastust (Neuroscience 4th ed., lk 129-130).

Lisaks ionotroopsetele, on ka kirjeldatud kolme tüüpi metabotroopseid glutamaadi retseptoreid (mGluR). Need retseptorid moduleerivad postsünaptilisi ionkanaleid kaudselt, olles ioonkanalitega ühenduses G-valkude vahendusel toimuva signaaliülekanne kaudu. Erinevalt ionotroopsetest, põhjustavad metabotroopsed glutamaadi retseptorid aeglasemat postsünaptilist vastust, mis võib tõsta või vähendada postsünaptiliste rakkude erutust (Neuroscience 4th ed., lk 131-133).

N-metüül-D-aspartaadi (NMDA) retseptorid on glutamaadi-vahendatud ioonkanalid, mis on tähtsal kohal sünaptiliste funktsioonide regulatsioonis kesknärvisüsteemis (Lau ja Zukin, 2007). NMDA retseptorite kaudu toimuv kaltsiumiioonide sissevool närvirakkudesse on vajalik närvisüsteemis toimuvateks füsioloogilisteks protsessideks. NMDA retseptorid koosnevad NR₁, NR₂ ja NR₃ subühikutest, mis, paiknedes plasmamembraanis, moodustavad kanaleid (Zhuo, 2009).

NMDA retseptor laseb läbi Na⁺, K⁺ ja Ca²⁺. Glutamaadi kinnitumisel retseptorile aktiveerub kanal ning ioonid pääsevad läbi. NMDA retseptori aktivatsioon sõltub lisaks glutamaadi sidumisele ka koagonistist glütsiinist ning depolarisatsioonist. NMDA retseptori aktiveerumisel on glütsiin seondunud NR₁ subühikuga ning glutamaat NR₂ subühikuga

(Clements ja Westbrook. 1991). Rakumembraani polariseerunud olekus on NMDA retseptori kanali poor blokeeritud magneesiumi iooniga, mis ei lase teistel ioonidel vabalt kanalit läbida. Kui toimub rakumembraani depolarisatsioon, väljub Mg^{2+} NMDA retseptorist. Pärast Mg^{2+} -i väljumist saavad Na^+ , K^+ ja Ca^{2+} läbi NMDA retseptori liikuda (Lau ja Zukin, 2007).

NMDA retseptorid on hipokampuse CA1 piirkonna püramidaalrakkudes väga olulised mälufunktsioonide täitmiseks (Nakazawa jt, 2004). Hipokampuse CA1 piirkonnas on ka väga intensiivne *Wfs1* ekspressioon (Luuk jt, 2008; Kawano jt, 2009). Tugevalt suurenenud Ca^{2+} kontsentratsiooni korral võivad käivituda ER stressi signaalrajad, mille negatiivseks regulaatoriks on *Wfs1*. Teisalt on näidatud *Wfs1* otsest rolli tsütoplasmaatilise Ca^{2+} kontsentratsiooni vähendamisel (Takei jt, 2006). Sellest tulenevalt on võimalik, et *Wfs1* ekspressiooni tase võib sõltuda NMDA retseptori kaudu sisenevast Ca^{2+} -st.

NMDA retseptori aktivatsioon hipokampuse CA1 piirkonnas tõstab kaltsium-kalmoduliin sõltuva adenülaadi tsüklaasi aktiveerimise teel cAMP taset (Chetkovich ja Sweatt, 1993). cAMP on rakusisene signaalmolekul, mida toodab ATP-st ensüüm adenülaadi tsüklaas. Hipokampuse CA1 piirkonnas ekspresseerub kaks kaltsium-kalmoduliin-sõltuvat adenülaadi tsüklaasi isovormi: AC1 ja AC8 (Nicol jt, 2005). AC1 on aktiivne väiksemate kaltsiumi kontsentratsioonide juures, AC8 aktiveerimiseks on vaja suurt Ca^{2+} taseme tõusu (Willoughby ja Cooper, 2007). Sünaptsid interakteerub AC8 ankurvalk AKAP79/150-ga, millega seondumine mõjutab negatiivselt AC8 aktiivsust (Willoughby jt, 2010). AKAP79/150-ga seondub ka proteiinkinaas A (PKA), mis on cAMP efektormolekul. PKA sünapsis paiknemine sõltub NMDA retseptori aktivatsioonist: NMDA retseptori aktivatsiooni järgselt transporditakse püsivalt AKAP79/150 koos PKA-ga sünapssist eemale (Smith jt, 2006).

AKAP79/150-PKA kompleksi sünapssist eemale transportimine võib toetada püsivat AMPA retseptori GluR1 subühiku fosforülatiooni langust. GluR1 PKA-st sõltuv fosforülatatsioon on vajalik selle lokaliseerumiseks raku pinnale, defosforüleerimine põhjustab AMPA retseptori endotsütoosi ja seega sünapsi erutuvuse vähenemist e pikaajalist sünaptilise signaaliülekanne pärssimist (*long term depression* e LTD) (Ehler, 2000; Snyder jt, 2005; Smith jt, 2006). Vastupidine protsess, sünapsi pikaajaline erutuvus (*long term potentiation* e LTP), sõltub samuti NMDA retseptori aktivatsioonist ning kaasab muutuseid AMPA retseptorite aktiivsuses ja postsünaptilises lokalisatsioonis, mida osaliselt kontrollib GluR1 subühiku fosforülatatsioon (Malenka ja Bear, 2004). Hipokampuse sünapside NMDA retseptoritest sõltuvad LTP ja LTD aitavad kaasa mäluprotsessidele ja õppimisele (Malenka ja Bear, 2004).

2. Eksperimentaalosa

2.1. Töö eesmärgid

Selle bakalaureusetöö eesmärkideks on:

- Hinnata hipokampuse lõigukultuuri sobivust geeniekspressiooni mõjutavate tegurite uurimiseks *in situ* hübriidisatsiooni meetodiga.
- Selgitada välja, kas söötme glükoosisisaldus mõjutab *Wfs1* ekspressiooni areneva hipokampuse lõikudes.
- Selgitada välja, kas NMDA retseptori inhibeerimine mõjutab *Wfs1* ekspressiooni ja kas see mõju sõltub glükoosi kontsentratsioonist.
- Selgitada välja, milline mõju on glükoosisisaldusel *Wfs1*-ga interakteeruva Grp94 ekspressioonile areneva hipokampuse lõikudel.
- Selgitada välja, kas NMDA retseptori inhibeerimine mõjutab *Grp94* ekspressiooni.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud hiireliin

Katsete läbiviimiseks kasutasime wt C57Bl/6 hiiri, keda peeti standardsetes laboritingimustes 12-tunnise öö-päeva tsükli ja vabalt kättesaadava toiduga.

2.2.2. Proovi süntees

RNA *antisense* ja *sense* proovide sünteesiks lineariseerisime hiire *Wfs1* cDNA segmenti sisaldava pGEM7 plasmidi ja viisime läbi *in vitro* transkriptsiooni vastavalt etteantud protokollile (Fermentas). *Antisense* proovi sünteesiks lõikasime plasmidi HindIII-ga (Fermentas) ja proovi sünteesisime T7 RNA polümeraasiga (Fermentas), *sense* proovi sünteesiks lõikasime plasmidi BamHI-ga (Fermentas) ja proovi sünteesisime Sp6 RNA polümeraasiga (Fermentas).

2.2.3. Organotüüpiliste hipokampuse lõikude kasvatamine

Vastsündinud Wt C57Bl/6 hiirepoegadelt dissekteerisime hipokampused jääkülmas ACSF lahuses (*Artificial Cerebrospinal Fluid*; 124 mM NaCl; 26 mM NaHCO₃; 5 mM KCl; 2 mM MgSO₄; 2mM CaCl₂; 1,25 mM NaH₂PO₄; 10 mM glükoos) ning lõikasime *tissue chopper*-iga

(McIlWain; Campden Instruments, Leicester, UK) 400 µm koronaallõikudeks. Lõike kultiveerisime Millicell-CM koekultuuri insertidel (Millipore, Bedford, MA) 0,4 ml söötme peal kuue-*well* istel söötmeplaatidel 37 °C ja 5% CO₂ juures. Kasutasime nelja erinevat söödet, mis baseerusid Stoppini söötmel (50% MEM Earle' sooladega (Gibco), 25% HBSS ilma CaCl₂ ja MgCl₂-ta (Gibco), 25% temperatuuriga inaktiveeritud hobuse seerum (Gibco), 10mM pH 7,34 HEPES puhver (AppliChem), 1X GlutaMaxI (Gibco), 36 mM glükoos (Roche)). ¼ lõike kasvasime modifitseerimata Stoppini söötmel, ¼ lõike kasvasime poole väiksema glükoosisisaldusega söötmel, ¼ lõike kasvasime söötmel, mis sisaldas 200 µM NMDA retseptori konkurentset inhibiitorit D,L-APV-d (*D,L-2-Amino-5-phosphonovalerate*; Sigma) ja ¼ lõike kasvasime poole väiksema glükoosisisalduse ja 200 µM D,L-APV-ga söötmel. Kõik söötmed sisaldasid antibiootikumisegu 100 U/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomütsiini (PAA). Söödet vahetasime mõne päeva tagant.

2.2.4. Whole-mount RNA in situ hübridisatsioon kultuuris kasvanud hipokampuse lõikudele

2.2.4.1. Fikseerimine

Kahaksa ööpäeva kultuuris kasvatatud hipokampuse lõigud fikseerisime neile jääkülma metanooli tilgutades ja seejärel tõstisime membraanid külma 4% PFA-ga PBS-i.

2.2.4.2. Eeltöötlus

Enne eeltöötluse algust ja iga etapi järel (välja arvatud proteinaas K töötlus) pesime hipokampuse lõike kaks korda 0,1% Tween-20 sisaldava PBS-ga (PBT-ga). Kõigepealt dehüdreerisime lõigud metanooliga (25%, 50%, 75%, 2X 100% metanooliga PBT-s, 5 minutit igas lahjenduses) ning rehüdreerisime vastupidises järjekorras. Seejärel permeabiliseerisime neid 10 µg/ml proteinaas K-d sisaldavas PBT-s. Hipokampusi töötlesime proteinaas K-ga 5 minutit. Permeabiliseeritud lõigud ja hipokampused tõstisime värskelt valmistatud 2 mg/ml glütsiini sisaldavasse PBT-sse, et blokeerida proteinaas K aktiivsus. Järgnevalt refikseerisime lõigud 4% PFA ja 0,2% glutaaraldehüüdiga PBT-s 20 minutit ning säilitasime kuni järgnevate protseduurideni eelhübridisatsioonisegus (50% formamiid, 5X SSC pH 5) -20 C juures.

2.2.4.3. Hübridisatsioon

Hipokampuse lõike eelhübridiseerisime 70 °C juures loksutil poolteist tundi eelhübridisatsioonisegus, mille koostis oli järgnev: 50% formamiid, 5X SSC pH 5, 1% SDS, 2% BR (*Blocking Reagent*, Roche). Hübridisatsioon toimus üleöö 70 °C juures loksutil, hübridisatsioonisegu koostis oli sama, mis eelhübridisatsioonil, kuid BR sisaldus oli 1% ning segule oli lisatud 1 µg/ml eelnevalt 5 min 80 °C juures kuumutatud ja jääl jahutatud digoksügeniiniga märgistatud RNA proovi.

2.2.4.4. Hübridisatsioonijärgsed pesud

Järgmisel päeval toimus 70 °C juures loksutil pesu 50% formamiidi, 5X SSC pH 5, 1% SDS lahusega 2X 30 minutit, sellele järgnes 2X 30 minutit pesu 65 °C juures 50% formamiidi, 2X SSC pH 5 lahusega. Seejärel loputasime hipokampuse lõigud toatemperatuuril kolm korda 1X TBST-ga.

2.2.5. Immunohistokeemia ja hübridisatsioonijärgsed pesud

Järgnevalt blokeerisime lõike tund aega toatemperatuuril 2% BR-ga 1X TBST-s ning inkubeerisime seejärel üleöö +4 °C juures aluselise fosfataasiga konjugeeritud anti-DIG antikehaga (Roche) lahjendatuna 1:2000 1% BR-ga 1X TBST-s.

2.2.6. Värvusreaktsioon

Lõike pesime 3X 10 minutit NTMT-s. Värvusreaktsiooni esilekutsumiseks lisasime aluselise fosfataasi substraati (Roche *BM purple AP substrate*). *Wfs1* RNA prooviga hübridiseeritud lõikudel lasime värvuda 2 tundi, *Grp94* RNA prooviga hübridiseeritudel 1 tunni.

2.2.7. Mikroskoopia

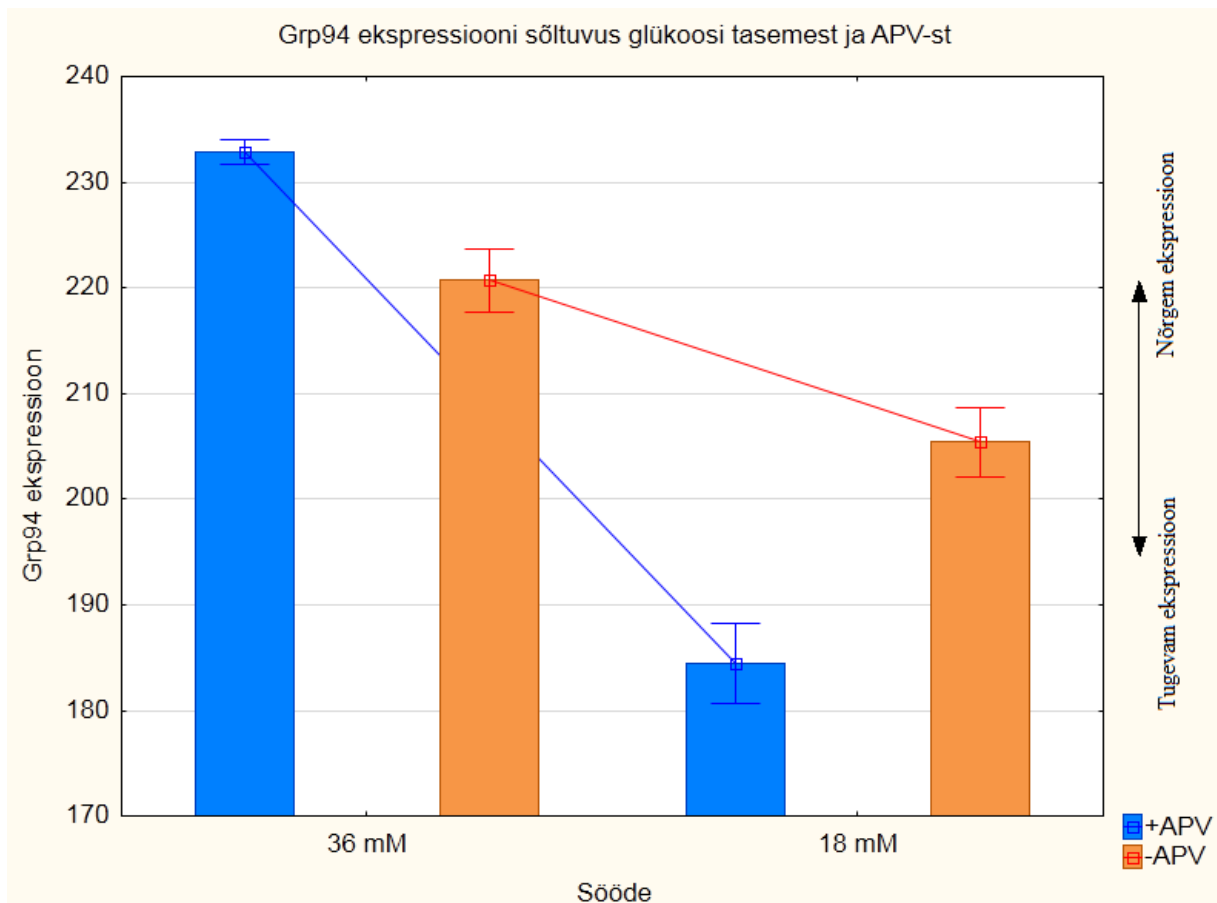
Hipokampuse lõikude kultuurid pildistasime Leica M165 FC mikroskoobiga.

2.2.8. Analüüs

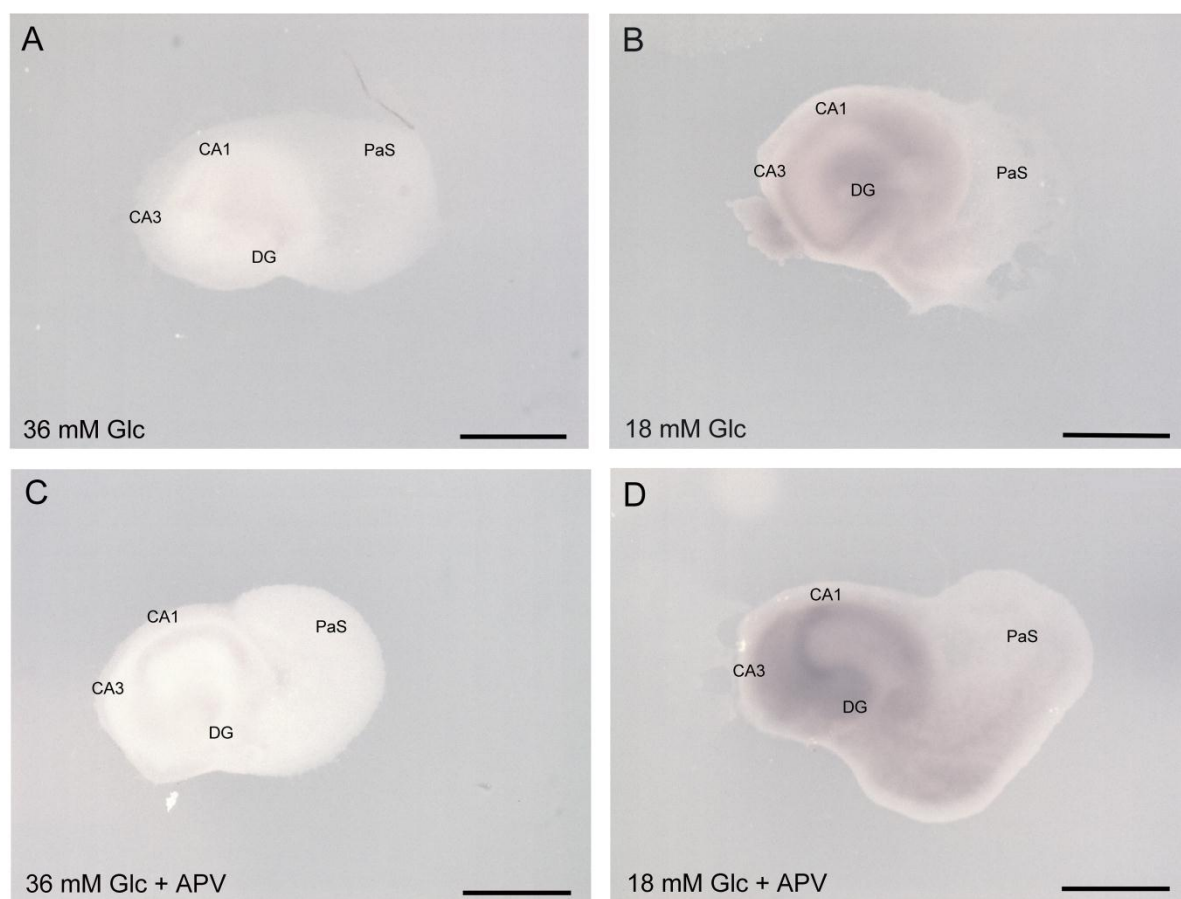
Hipokampuse lõikudelt mõõtsime ekspressiooni tugevust programmiga ImageJ ning seejärel tulemuste analüüsiks kasutasime STATISTICA programmi kahefaktorilist ANOVA testi, millega vaatasime söötmes vähendatud glükoositaseme ja NMDA retseptori inhibiitori (APV) mõju *Grp94* ja *Wfs1* ekspressioonile.

2.3. Tulemused

Kuna eelnevate autorite poolt on näidatud (Lee jt, 1981; Shiu jt, 1977; Spindler jt, 1990), et glükoosi tase võib sõltuvalt eksperimendi ülesehitusest *Grp94* ekspressiooni kas suurendada või vähendada, tahtsime kontrollida, kuidas meie süsteemis söötme glükoosi taseme alandamine *Grp94* ekspressiooni mõjutab. Lisaks vaatasime, kas NMDA retseptori inhibeerimine mõjutab *Grp94* ekspressiooni või söötme glükoosi taseme mõju sellele. Glükoosi kontsentratsiooni vähendamine söötmes tõstis *Grp94* ekspressiooni taset ($F_{(1, 15)}=120,35$; $p<0,001$). *Grp94* ekspressiooni tase ei sõltunud NMDA retseptori inhibiitori APV lisamisest söötmele. Kui vähendada glükoosi kontsentratsiooni ning lisada söötmele APV-d, võimendas see vähendatud glükoosi taseme mõju, tõstes *Grp94* ekspressiooni taset veelgi ($F_{(1, 15)}=32,64$; $p<0,001$) (graafik 1). Näidised eksperimendis kasutatud hipokampuse lõikudest on joonisel 3.

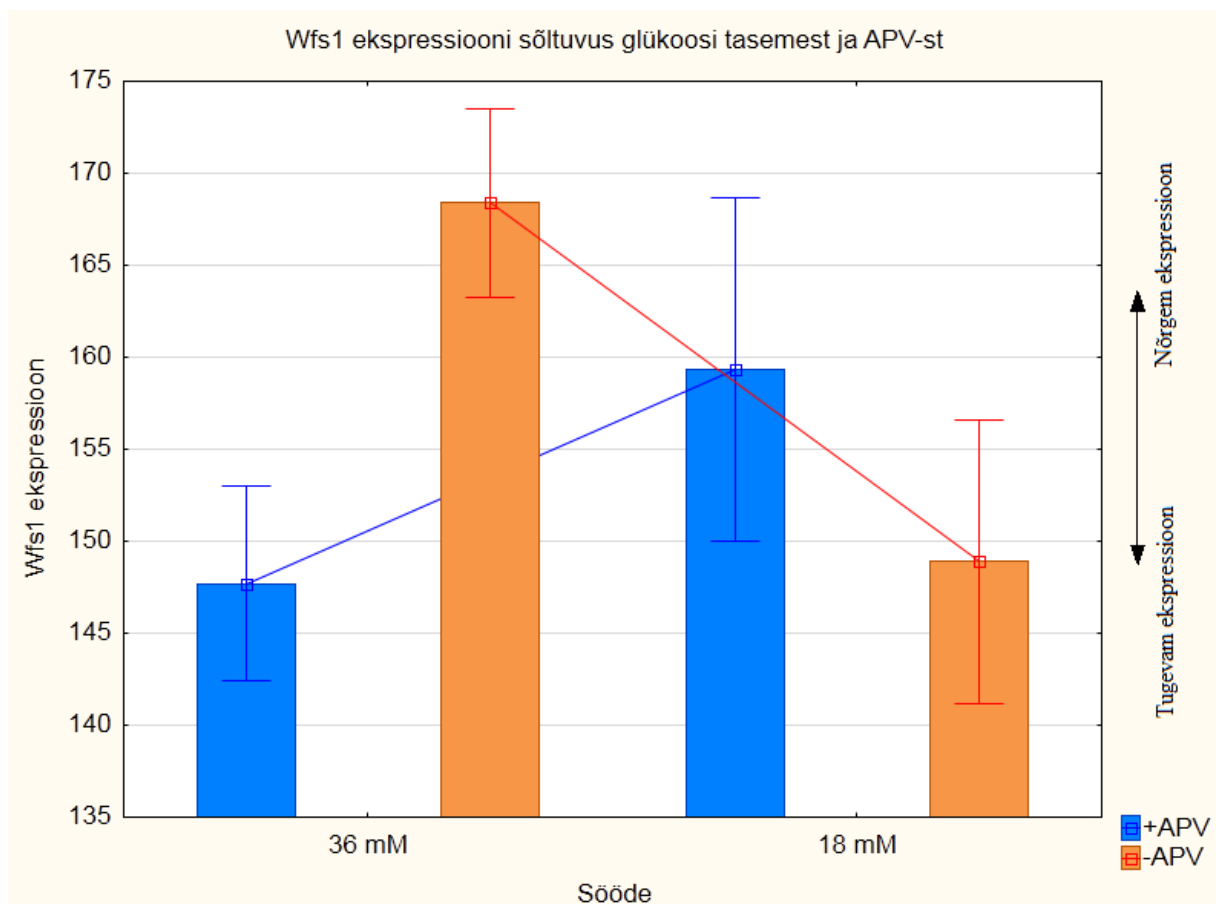


Graafik 1: *Grp94* ekspressiooni sõltuvus glükoosi tasemest ja NMDA retseptori inhibiitorist (APV). 36mM on tavalise glükoosi kontsentratsiooniga sööde ja 18mM on vähendatud glükoosi kontsentratsiooniga sööde. +APV söötmele on lisatud inhibiitorit, -APV söötmele ei ole lisatud inhibiitorit. Suurem y-telje numbriline väärtus näitab madalamat ekspressioonitaset. Analüüsiks on kasutatud ANOVA kahefaktorilist testi. Tulpadel on näidatud standardviga.

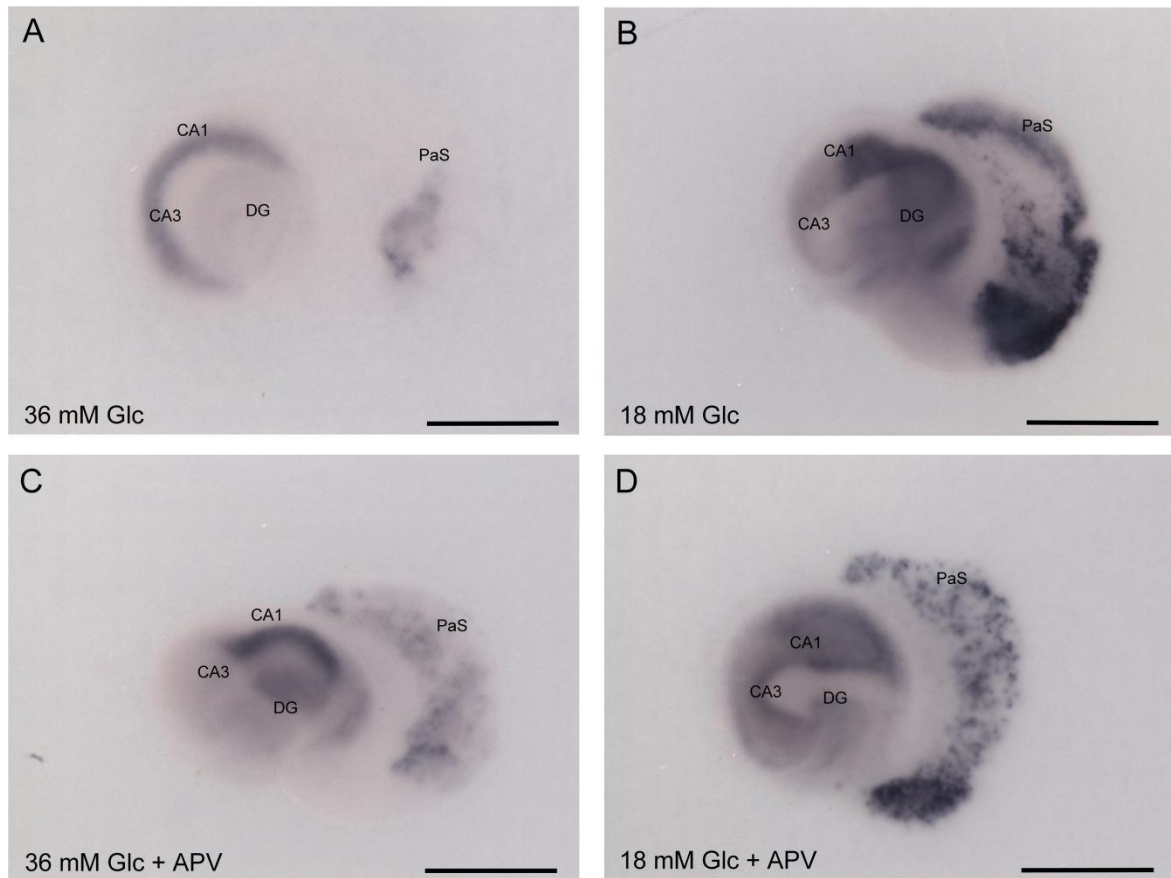


Joonis 3: *Grp94* ekspressioon hiire (*Mus musculus*) hipokampuse lõikudel. *In situ* hübridisatsioon. Hipokampuse lõigud on kasvatatud A - 36 mM glükoosisisaldusega söötmel, B - 18 mM glükoosisisaldusega söötmel, C - 36 mM glükoosisisaldusega söötmel, millele on lisatud NMDA retseptori inhibiitorit (APV), D - 18 mM glükoosisisaldusega söötmel, millele on lisatud NMDA retseptori inhibiitorit (APV). PaS- *parasubiculum*, CA1- hipokampuse *Cornu ammonis* 1 piirkond, CA3- hipokampuse *Cornu ammonis* 3 piirkond, DG- hammaskäär. Mõõtkava on 500 μ m.

Teise katsega tahtsime vaadata, kuidas mõjutab glükoosi kontsentratsiooni muutus ning NMDA inhibiitori lisamine söötmele *Wfs1* ekspressiooni taset. Tulemuseks saime, et glükoosi kontsentratsiooni vähendamine ei mõjutanud *Wfs1* ekspressiooni taset. *Wfs1* ekspressiooni taset ei mõjutanud ka APV lisamine söötmele. Kui aga vähendasime glükoosi kontsentratsiooni ning lisasime söötmele NMDA retseptori inhibiitorit, vähenes *Wfs1* ekspressiooni tase, ning vastupidi, kui glükoosi oli söötmes rohkem, põhjustas see *Wfs1* ekspressiooni tugevnemise ($F_{(1, 51)}=4,981$; $p<0,05$) (graafik 2). Näidised eksperimendis kasutatud hipokampuse lõikudest on joonisel 4.



Graafik 2: *Wfs1* ekspressiooni sõltuvus glükoosi tasemest ja NMDA retseptori inhibiitorist (APV). 36mM on tavalise glükoosi kontsentratsiooniga sööde ja 18mM on vähendatud glükoosi kontsentratsiooniga sööde. +APV söötmele on lisatud inhibiitorit, -APV söötmele ei ole lisatud inhibiitorit. Suurem y-telje numbriline väärtus näitab madalamat ekspressioonitaset. Analüüsiks on kasutatud ANOVA kahefaktorilist testi. Tulpadel on näidatud standardviga.



Joonis 4: *Wfs1* ekspressioon hiire (*Mus musculus*) hipokampuse lõikudel. *In situ* hübridisatsioon. Hipokampuse lõigud on kasvatatud A - 36 mM glükoosisaldusega söötmel, B - 18 mM glükoosisaldusega söötmel, C – 36 mM glükoosisaldusega söötmel, millele on lisatud NMDA retseptori inhibiitorit (APV), D – 18 mM glükoosisaldusega söötmel, millele on lisatud NMDA retseptori inhibiitorit (APV). PaS- parasubiculum, CA1- hipokampuse *Cornu ammonis* 1 piirkond, CA3- hipokampuse *Cornu ammonis* 3 piirkond, DG- hammaskäär. Mõõtkava on 500 μ m.

2.4. Arutelu

Käesoleva töö eesmärk oli selgitada glükoosi kontsentratsiooni ja NMDA retseptori kaudu toimuva sünaptilise ülekande mõju *Grp94* ja *Wfs1* ekspressioonile arenevas hipokampuses.

Kirjanduses on näidatud, et *Wfs1* moodustab β -rakkudes ja närvirakkudes kompleksi *Grp94*-ga (Kakiuchi jt, 2009; Fonseca jt, 2012). β -rakkudes nõrgendab glükoosiga stimuleerimine *Grp94* ja *Wfs1* interaktsiooni, mille tõttu toimub *Wfs1* translokatsioon ER-i membraanist plasmamembraani (Fonseca jt, 2012). Kuna *Wfs1* rakusisene paiknemine sõltub glükoosi tasemest, võis oletada, et ka *Wfs1* ekspressioon on glükoosist sõltuv. Meie tulemused näitasid,

et ainult glükoosisisalduse vähendamine söötmes 36 mM-lt 18 mM-le ei mõjuta *Wfs1* ekspressiooni 8 päeva kultuuris kasvatatud P0 hipokampuse lõikudel. Et aga *Wfs1* ekspressiooni tugevus varieerus katsegruppide siseselt suuresti, võiks teha lisakatseid veel väiksemate glükoosi kontsentratsioonidega.

Kontrolliks vaatasime samades tingimustes ka *Grp94* ekspressiooni, kuna erinevates süsteemides on näidatud, et *Grp94* ekspressioon suureneb söötme glükoosi taseme vähendamisel (Shiu jt, 1977; Lee jt, 1983; Barnes jt, 1999). Meie katse tulemused olid kooskõlas kirjanduse andmetega, *Grp94* ekspressioon tõusis, kui vähendasime söötme glükoosisisaldust 36 mM-lt 18 mM-le. *Grp94* ekspressiooni tõusu põhjuseks vähendatud glükoositaseme korral võib olla N-seoselise glükosüleerimise vähenemine ja piisavalt glükosüleerimata valkude kuhjumine ER-i (Kozutsumi jt, 1988). Kultiveeritud hiire embrüotel on näidatud, et juba väike glükoositaseme vähendamine võib mõjutada Grp-de taset (Barnes jt, 1999).

NMDA retseptorid on hipokampuse CA1 piirkonnas väga tähtsad mälu funktsioonide täitmiseks, lastes närvirakkudesse Ca^{2+} (Nakazawa jt, 2004; Zhuo, 2009). NMDA retseptori kaudu toimuv Ca^{2+} sissevool võib muuta nii sünapsi valkude paigutust kui viia geeniekspressiooni muutusteni (Arundine ja Tymianski, 2004; Kleinschmidt jt, 1987; Rabacchi jt, 1992). Kuigi käesoleva töö käigus tehtud katsed ei näidanud, et ainult NMDA retseptori inhibeerimine oleks mõjutanud *Wfs1* või *Grp94* ekspressiooni, tuli mõlema geeni puhul oluliseks NMDA retseptori inhibeerimise koosmõju söötme glükoosi kontsentratsiooni vähendamisega.

NMDA retseptorite liigne aktivatsioon võib olla neuronitele letaalne. Intensiivne kaltsiumi sissevool NMDA retseptoritest võib raku kaltsiumitaseme regulatsiooni paigast lüüa, mille tagajärjel aktiveeritakse erinevad signaalirajad, mis viivad raku surmani (Tymianski jt, 1993). Kuna on näidatud *Wfs1* rolli nii tsütoplasma kaltsiumi kontsentratsiooni vähendamisel (Takei jt, 2006) kui ER stressi signaaliraja reguleerimisel (Fonseca jt, 2010), võiks oletada, et NMDA retseptori kaudu sisenev kaltsium võib mõjutada *Wfs1* ekspressiooni või lokalisatsiooni. Kuigi NMDA retseptori inhibeerimine ei põhjustanud meie katses erinevust *Wfs1* ekspressioonis, tuleks katseid veel korrata, kuna oluline koosmõju söötme glükoosi kontsentratsiooniga viitab sellele, et NMDA retseptori funktsioon ikkagi mõjutab *Wfs1* ekspressiooni. Et paremini selgitada NMDA retseptori mõju *Wfs1* ekspressioonile, võiks vaadata, kas NMDA retseptori aktiveerimine spetsiifilise agonistiga *Wfs1* ekspressiooni mõjutab.

Sellele, et eksisteerib seos *Wfs1* ja rakkude kaltsiumitasakaalu vahel, viitavad kaudselt ka kliinilised andmed. On näidatud, et bipolaarsus on sagedane häire *Wfs1* puudulikkusega patsientidel (Kawamotoa jt, 2004). Bipolaarse häirega psühhiaatrilistel patsientidel on leitud, et vererakkudes on Ca^{2+} tase normaalsest kõrgem (Dubovsky jt, 1989; Emamghoreishi jt, 1997). Meeleolu stabilisaatorid, mida kasutatakse bipolaarsuse raviks, näiteks valproaat ja liitium, võivad reguleerida rakkude kaltsiumisisaldust. On näidatud, et liitium blokeerib kaltsiumi liigse sissepääsu NMDA retseptorite kaudu (Nonaka jt, 1998). Valproaadil on otsene mõju *Wfs1* ekspressioonile (Kakiuchi jt., 2009) ja võib-olla selle kaudu tsütoplasma kaltsiumisisaldusele.

AC8, mis glükoosiga stimuleerides seondub pankrease β -rakkudes *Wfs1*-ga, paikneb neuronites erutavates sünapsites ja on seotud ankurvalg AKAP79/150-ga (Fonseca jt, 2012; Willoughby jt, 2010). Ankurvalguga seondub ka cAMP-i efektormolekul PKA, mille paiknemine sõltub NMDA retseptori aktivatsioonist, kuna NMDA retseptori aktivatsiooni tagajärjel transporditakse AKAP79/150-PKA kompleks sünapsist eemale (Smith jt, 2006). Pole uuritud, kas *Wfs1* seondub AC8-ga ka neuronites, aga kui see nii on, võib arvata, et *Wfs1* võib teatud tingimustel paikneda samas NMDA retseptorist sõltuvas kompleksis. *Wfs1* rakusisese lokaliseerimise uurimine hipokampuse neuronites võib sellele küsimusele valgust heita.

NMDA retseptori inhibeerimine ei mõjutanud *Grp94* ekspressiooni, kuid ka siin tuli oluliseks koostöö glükoosisisaldusega: APV lisamine võimendas glükoosi taseme vähendamisel tingitud *Grp94* ekspressiooni tõusu. On näidatud, et pärast hapniku ja glükoosi söötmetest ärajätmist tõuseb neuronites Grp-de ekspressioon, millele järgneb 48 h pärast ekspressiooni langus, mis on ilmselt tingitud püsivale ER stressile järgnevast suuremahulisest neuronite hävinemisest (Badiola jt, 2011). Kaspaas-12 on ER stressi korral indutseeritav, apoptoosi vahendav kaspaas (Nakagawa ja Yuan 2000). On näidatud, et hapniku ja glükoosi ärajätmine põhjustab neuronites kaspaas-12 lõikamise, mida reguleerib NMDA retseptor (Chen jt, 2008; Badiola jt, 2011). Sellest tulenevalt võiks järeldada, et ER stressi tingimustes võib NMDA retseptori inhibeerimine omada antiapoptootilist efekti. Teisest küljest võib NMDA retseptori inhibeerimine ER-i kaltsiumitasakaalu paigast nihutada ning seega hoopis aktiveerida UPR-i ja *Grp*-de transkriptsiooni.

Kokkuvõtteks võib öelda, et hipokampuse lõigukultuuris *in situ* hübriidiseerimise meetodiga geeniekspressiooni uurimine on võimalik, kuid katseprotokoll vajab veel optimeerimist, kuna katsegruppide siseselt esines kohati päris suur varieeruvus. Võimalik, et suure varieeruvuse

tõttu ei õnnestunud olulisi mõjusid tuvastada. Meie tulemused näitasid glükoosisisalduse vähendamise ja APV lisamise koosmõju tähtsust *Wfs1* ekspressioonile, kuid mitte nende faktorite mõju eraldi. Kuna praeguse valimiga ei õnnestunud vähenenud glükoosisisalduse ega APV mõju *Wfs1* ekspressioonile leida, peaks edasi uurima täpsemalt nende eraldi mõju. Esiteks võiks vähendada glükoosi kontsentratsiooni söötmes veel rohkem, teha näiteks katseid glükoosi füsioloogilistes tingimustes, kus aju jaoks glükoosi kontsentratsioon kõigub vahemikus 0,82 - 2,4 mM (Silver ja Erecińska 1994; Abi-Saab jt, 2002). Teiseks võiks vaadata *Wfs1* ekspressiooni vanematel hipokampustel, kus on erinevad ekspressioonipiirkonnad paremini tuvastatavad. Nendel lõikudel saaks eraldi mõõta *Wfs1* ekspressiooni kindlas hipokampuse regioonis, kuna näiteks hipokampuse CA1 piirkonnas on väga tugev *Wfs1* ekspressioon (Luuk jt, 2008; Kawano jt, 2009). Kolmandaks võiks vaadata kogu neuraalse aktiivsuse allasurumise mõju *Wfs1* ekspressioonile.

Kokkuvõte

Wolframi sündroom on haruldane neurodegeneratiivne autosomaalne retsessiivne haigus, mille sümptomiteks on magediabeet (*diabetes insipidus*), insuliini-puudulik suhkurtõbi (*insulin deficient diabetes mellitus*), nägemisnärv atroofia (*optic atrophy*) ja kurtus (*deafness*) (Swift jt, 1990). *Wfs1*-l on füsioloogilisi funktsioone membraani *trafficking*-s, sekretsioonis, valkude protsessingus, ER kaltsiumi homöostaasi ja ER stressi vastuse (UPR e *unfolded protein response*) regulatsioonis (Yamaguchi jt, 2004; Yamada jt, 2006; Zatyka jt, 2008). Glükoosiga stimuleerimine põhjustab pankrease β -rakkudes *Wfs1* translokatsiooni ER-i membraanist plasmamembraani, kus kalmoduliini ja AC8-ga seundumine suurendab cAMP-i tootmist (Fonseca jt, 2012).

NMDA retseptorite kaudu toimuv kaltsiumiioonide sissevool närvirakkudesse on vajalik närvisüsteemis toimivateks füsioloogilisteks protsessideks (Zhuo, 2009). NMDA retseptori inhibeerimine takistab Ca^{2+} sissevoolu rakkudesse ning on näidatud *Wfs1* rolli tsütoplasmaatilise Ca^{2+} kontsentratsiooni vähendamisel (Takei jt, 2006).

Glükoosi puudus käivitab UPR-i, mille käigus omakorda indutseeritakse transkriptsioon glükoosi reguleeritud valk 94 (*Grp94*) geenilt (Lee jt, 1983). *Grp94* on vajalik teiste UPR-ga seotud valkude õigeks kokkupakkimiseks (Ostrovsky jt, 2009).

Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas uurisime, kas ja kuidas sõltub *Wfs1* ja *Grp94* ekspressioon glükoosisisaldusest ja NMDA retseptori kaudu toimuvast sünaptilisest ülekandest vastündinud hiire (*Mus musculus*) kaheksa ööpäeva kultuuris kasvatatud hipokampuse lõikudel.

Kasvatasime hipokampuse lõike standardsel ja vähendatud glükoosisisaldusega söötmel, kus olime vähendanud glükoosi kontsentratsiooni 36 mM-lt 18 mM-le. Söötmel glükoosi kontsentratsiooni vähendamine ei mõjutanud *Wfs1* ekspressiooni. Ka NMDA retseptori inhibeerimine ei mõjutanud *Wfs1* ekspressiooni, küll aga esines kahe faktori koosmõju: vähendatud glükoositaseme korral põhjustas APV lisamine *Wfs1* ekspressiooni vähenemise, kõrge glükoosi kontsentratsiooni korral põhjustas APV lisamine *Wfs1* ekspressiooni tõusu. Kuna *Wfs1* ekspressiooni intensiivsus tugevalt varieerus, tuleks teha lisakatseid veel madalamatel glükoosi kontsentratsioonidel.

Glükoosi kontsentratsiooni vähendamine tõstis *Grp94* ekspressiooni, mis võiks olla tingitud ER stressi tagajärjel aktiveerunud UPR-st, mille korral aktiveeritakse *Grp94* ekspressioon. Glükoosisisalduse vähendamisest sõltuvat *Grp94* ekspressiooni on näidanud ka näiteks Shiu

töörühm kana embrüote fibroblastidel (1977), Lee töörühm hamstri fibroblastidel (1983) ja Barnes'i töörühm hiire südames (1999).

NMDA retseptori inhibeerimine ei mõjutanud *Grp94* ekspressiooni, kuid koosmõjus glükoosi taseme vähendamisega tõstis see *Grp94* ekspressiooni veelgi võrreldes ainult glükoosi taseme vähendamisega. Põhjus võib olla selles, et Ca^{2+} vähenemine suurendab glükoosi kontsentratsiooni vähenemisest tingitud ER stressi, mille käigus suureneb *Grp94* ekspressioon.

Katsete käigus selgus, et hipokampuse lõigukultuur on sobiv süsteem geeniekspressiooni mõjutavate tegurite uurimiseks *in situ* hübriidisatsiooni meetodiga, kuna glükoosi kontsentratsiooni taseme vähendamine mõjutas *Grp94* ekspressiooni. Järelikult võib geenide avaldumise määramisel neid tulemusi usaldada ning sama süsteemi võib kasutada ka edasiste katsete käigus.

The dependence of *Wfs1* and *Grp94* expression from the glucose level and the inhibition of NMDA receptor in the hippocampus of a mouse (*Mus musculus*)

Laura Truu

Summary

Wolfram syndrome (WS) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder, also known as DIDMOAD (*diabetes insipidus*, insulin-deficient *diabetes mellitus*, optic atrophy and deafness). The disease is caused by mutations in the *WFS1* gene, which encodes an endoplasmic reticulum (ER) protein (WFS1). Wfs1 participates in the functions of membrane trafficking, secretion, protein processing, ER calcium homeostasis and ER stress response regulation. Disturbances in these processes can cause ER stress responses, which could lead to apoptosis. This leads to pancreatic β -cell loss and progression of type 2 diabetes. Wfs1 is essential for glucose-stimulated cyclic AMP production and regulation of insulin biosynthesis and secretion. Stimulation with glucose leads to Wfs1 translocation from the ER to the plasma membrane, where Wfs1 and adenylyl cyclase 8 (AC8) form a complex. AC8 is an essential cAMP-generating enzyme in the β -cells, which is activated by Ca^{2+} . Mutations in *Wfs1* gene cause reduced cAMP synthesis and insulin secretion. Wfs1 also forms a complex with an ER chaperone, glucose-regulated protein 94 (Grp94) in the pancreatic β -cells and in neuronal cells. Under basal conditions the complex has a strong interaction, which weakens when the cells are stimulated with glucose. This stimulation allows Wfs1 to leave from the ER to the plasma membrane, where it forms a complex with AC8 and calmodulin. In the presence of ER stress; however, the complex stays attached, helping Wfs1 to function in relieving ER stress, which leads to β -cell reduction. Whereas Wfs1 functions are extensively studied in the pancreatic β -cells, its role in neurons remains more elusive. Therefore when glucose stimulation leads to Wfs1 translocation, it may have an influence on *Wfs1* expression.

Grp94 is a high capacity Ca^{2+} binder, which regulates Grp94 activity. Ca^{2+} influx is regulated by NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor, which is an ionotropic glutamate receptor. NMDA receptors have an important role in brain function in the pyramidal cells of the hippocampal CA1 region. There is also a strong *Wfs1* expression in the hippocampal CA1 region. Strongly increased Ca^{2+} levels can activate the ER stress pathway, which is negatively regulated by Wfs1. It has been shown that Wfs1 lowers the cytoplasmic Ca^{2+} levels.

Therefore the *Wfs1* expression may depend on the Ca^{2+} influx, which enters the cell via the NMDA receptor.

The aim of this study was to find out whether the expression of *Wfs1* and *Grp94* is dependent on glucose levels and/or on NMDA receptor-mediated synaptic activity. We studied the expression of *Wfs1* and *Grp94* on mouse P0 hippocampal slices cultured on two different glucose concentrations (36 mM and 18 mM) in the presence or absence of NMDA receptor inhibitor D,L-APV.

The results showed, that the lowered glucose levels made an impact only to *Grp94* expression. *Grp94* expression was increased, when glucose concentration was lowered.. Adding NMDA receptor inhibitor enhanced the effect of reducing glucose concentration, even though the inhibitor by itself did not have an effect on *Grp94* expression. Changing the glucose level nor suppressing NMDA receptor activity changed *Wfs1* expression. When the interaction was taken into account, inhibiting NMDA receptors lowered *Wfs1* expression when glucose level was low, but increased *Wfs1* expression when glucose level was high. However, as the *Wfs1* expression showed considerable heterogeneity between individual hippocampal slices, further studies with bigger sample sizes are needed to investigate the impact of glucose concentration and NMDA receptor-mediated neural activity on *Wfs1* expression in the hippocampus.

Tänuavaldused

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajaid Triin Tekkot ja Kersti Lillevälja, kes olid alati abivalmid ning juhendasid mind suurte oskuste ja teadmistega.

Täna ka TÜMRI arengubioloogia õppetooli, füsioloogia ja farmakoloogia instituutide toredaid kollektiive, kes ei jätnud mind kordagi keerulises olukorras hätta. Lisaks sellele soovin tänada Märt Mölsi, Jaanus Remmi ja Kairi Kiike abi eest katsetulemuste analüüsil.

Kirjanduse loetelu

Ajakirjad

Abi-Saab WM, Maggs DG, Jones T, Jacob R, Srihari V, Thompson J, Kerr D, Leone P, Krystal JH, Spencer DD, During MJ, Sherwin RS. (2002). Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(3):271-9.

Arundine M., Tymianski M.. (2004). Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 657–668.

Ashcroft, F. M. & Rorsman. (2012). Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *P. Cell* 148, 1160–1171 .

Audouard C, Le Masson F, Charry C, Li Z, Christians E. (2011). Oocyte-targeted deletion reveals that hsp90b1 is needed for the completion of first mitosis in mouse zygotes. *PLoS One.* 15; 6(2):e17109.

Back, S. H. & Kaufman. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *R. J. Annu. Rev. Biochem.* 81, 767–793 .

Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Sánchez-Opazo G, Comella JX, Sabriá J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, Rodríguez-Alvarez J. (2011). Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell Death Dis.* 2:e149.

Barnes JA, Smoak IW, Branch S. (1999). Expression of glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94) in hearts and fore-limb buds of mouse embryos exposed to hypoglycemia in vitro. *Cell Stress Chaperones.* 4(4):250-8.

Cala SE, Jones LR. (1994). GRP94 resides within cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles and is phosphorylated by casein kinase II. *J Biol Chem.* 25; 269(8):5926-31.

Chen X, Kintner DB, Luo J, Baba A, Matsuda T, Sun D. (2008). Endoplasmic reticulum Ca^{2+} dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Cl}^{-}$ cotransporter. *J Neurochem.* 106(4):1563-76.

- Chetkovich DM, Sweatt JD. (1993). NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. *J Neurochem.* Nov;61(5):1933-42.
- Clements JD, Westbrook GL. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron.* 7(4):605-13.
- Concannon CG, Ward MW, Bonner HP, Kuroki K, Tuffy LP, Bonner CT, Woods I, Engel T, Henshall DC, Prehn JH. (2008). NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal apoptosis in vitro and in vivo occurs in an ER stress and PUMA independent manner. *J Neurochem.* 105(3):891-903.
- Delmeire, D. et al. (2003). Type VIII adenylyl cyclase in rat β cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia* 46, 1383_1393.
- Dubovsky SL, Christiano J, Daniell LC, Franks RD, Murphy J, Adler L, Baker N, Harris RA. (1989). Increased Platelet Intracellular Calcium Concentration in Patients With Bipolar Affective Disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 46(7):632-8.
- Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. (1998). "Insulin degradation: progress and potential". *Endocr. Rev.* 19 (5): 608–24.
- Ehlers MD. (2000). Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511–525.
- Emamghoreishi M, Schlichter L, Li PP, Parikh S, Sen J, Kamble A, Warsh JJ. (1997) High intracellular calcium concentrations in transformed lymphoblasts from subjects with bipolar I disorder. *Am J Psychiatry* 154:976–982.
- Fonseca S. G. Et al. (2012). Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nature Cell Biology* 14, 1105–1112 .
- Fonseca, S. G. et al. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J. Clin. Invest.* 120, 744–755 .
- Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, Niu W, Klip A. (2002). Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol.* 80:569–78.

- Gabreëls, B.A., Swaab, D.F., de Kleijn, D.P. (1998). The vasopressin precursor is not processed in the hypothalamus of Wolfram syndrome patients with diabetes insipidus: evidence for the involvement of PC2 and 7B2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (11):4026–4033.
- Hansotia, T. & Drucker. (2005). GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *D. J. Regul. Pept.* 128, 125–134 .
- Henquin JC. (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia.* 52(5):739-51.
- Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD et al. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet.* 12(16): 2003–2012.
- Huang Yan-You, Li Xiao-Ching, Kandel Eric R. (1994). cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell.* 79(1): 69–79.
- Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E et al. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet* 20:143–148.
- Ishihara H., Takeda S., Tamura A., Takahashi R., Yamaguchi S., Takei D., Yamada T., Inoue H., Soga H., Katagiri H., Tanizawa Y., Oka Y.. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.*, 13 pp. 1159–1170.
- Jensen, M. V. et al. (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1287–E1297.
- Kakiuchi C, Ishigaki S, Osowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F. (2009). Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One* 4:e4134.
- Kakiuchi C, Ishiwata M, Hayashi A, Kato T. (2006). XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 97(2):545-55.

- Kazu Nakazawa, Thomas J. McHugh, Matthew A. Wilson, Susumu Tonegawa. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 361-372.
- Kato T., Ishiwata M., Yamada K., Kasahara T., Kakiuchi C., Iwamoto K., Kawamura K., Ishihara H., Oka Y. (2008). Behavioral and gene expression analyses of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci. Res.*, 61 pp. 143–158.
- Kaufman R. S. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 13, pp. 1211-1233.
- Kawamotoa Takanori, Horikawab Yukio, Tanakaa Takeshi, Kabea Noriko, Takedab Jun, Mikunia Masahiko. (2004). Genetic variations in the WFS1 gene in Japanese with type 2 diabetes and bipolar disorder. *Molecular Genetics and Metabolism*. 82(3):238–245.
- Kawano J., Tanizawa Y., Shinoda K. (2008). Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system. *J. Comp. Neurol.*, 510 pp. 1–23.
- King LS, Berg M, Chevalier M, Carey A, Elguindi EC, Blond SY. (2001). Isolation, expression, and characterization of fully functional nontoxic BiP/GRP78 mutants. *Protein Expr Purif*. 22(1):148-58.
- Kleinschmidt A, Bear MF, Singer W. (1987). Blockade of "NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science*. 238(4825):355-358.
- Kleman Amy M., Yuan Jason Y., Aja Susan, Ronnett Gabriele V., and Landree Leslie E.. (2008). Physiological Glucose is Critical for Optimized Neuronal Viability and AMPK Responsiveness In Vitro. *J Neurosci Method*. 167(2): 292–301.
- Koch G, Smith M, Macer D, Webster P, Mortara R. (1986). Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J Cell Sci*. 86():217-32.
- Kozutsumi Y., Segal M., Normington K., Gething M.J., Sambrook J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332:462–464.
- Lau C. G and R. S. Zukin. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Neuroscience*. 8(6): 413-26.

- Laybutt, D. R. et al. (2007) Endoplasmic reticulum stress contributes to β - cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 752_76 .
- Lee A.S. (1992). Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4, pp. 267–273.
- Lee A.S. (2001). Review The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem.* 26(8): 504–510.
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 23(21):7448-59.
- Lee AS. (1981). The accumulation of three specific proteins related to glucose-regulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. *J Cell Physiol.* 106(1):119-25.
- Lee AS. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 35(4):373-81.
- Lee, A. S., Delegeane, A. M., Baker, V., and Chow, P. C. (1983). Transcriptional regulation of two genes specifically induced by glucose starvation in a hamster mutant fibroblast cell line. *J. Biol. Chem.* 258, 597– 603.
- Lemaire K. and Schuit F. (2012). Integrating insulin secretion and ER stress in pancreatic β -cells. *Nature Cell Biology* 14 – 10, 979 – 981.
- Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. (1994). The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 4(1):1-18.
- Luo S, Mao C, Lee B, Lee AS. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol.* 26(15):5688-97.
- Luuk H, Koks S, Plaas M, Hannibal J, Rehfeld JF, Vasar E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol.* 509(6): 642-60.
- Malenka RC, Bear MF. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5–21.

Marchetti et al. (2007). The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia*. Vol: 50:2486-2494.

Marzec Michal, Eletto Davide, and Argona Yair. (2012). GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the Endoplasmic Reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 1823(3): 774–787.

Nakagawa T, Yuan J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 150(4):887-94.

Nguyen PV, Woo NH. (2003). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 71: 401–437.

Nicol Xavier, Muzerelle Aude, Bachy Isabelle, Ravary Anne, Gaspar Patricia. (2005). Spatiotemporal localization of the calcium-stimulated adenylate cyclases, AC1 and AC8, during mouse brain development. *Journal of Comparative Neurology*. 486(3):281–294.

Nonaka Shigeyuki, Hough Christopher J. and Chuang De-Maw. (1998) Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-d-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2642–2647.

Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. (2008). Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*. 15:1304–1317.

Ostrovsky O, Ahmed NT, Argon Y. (2009). The chaperone activity of GRP94 toward insulin-like growth factor II is necessary for the stress response to serum deprivation. *Mol Biol Cell*. 20(6):1855-64.

Rabacchi S, Bailly Y, Delhay-Bouchaud N, Mariani J. (1992). Involvement of the N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor in synapse elimination during cerebellar development. *Science*. 256(5065):1823-5.

Randow F, Seed B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol*. 3(10):891-6.

Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. & Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99–111.

- Shiu R.P., Pouyssegur J., Pastan I. (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74(9):3840–3844.
- Silver IA, Erecińska M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci.* 14(8):5068-76.
- Smith KE, Gibson ES, Dell'Acqua ML. (2006). cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein. *J Neurosci.* 26(9):2391-402.
- Snyder EM, Colledge M, Crozier RA, Chen WS, Scott JD, Bear MF. (2005). Role for A kinase-anchoring proteins (AKAPS) in glutamate receptor trafficking and long term synaptic depression. *J Biol Chem* 280:16962–16968.
- Spindler S.R., Crew M.D., Mote P.L., Grizzle J.M., Walford R.L. (1990). Dietary energy restriction in mice reduces hepatic expression of glucose-regulated protein 78 (BiP) and 94 mRNA. *J. Nutr.* 120:1412–1417.
- Srivastava PK. (1993). Review Peptide-binding heat shock proteins in the endoplasmic reticulum: role in immune response to cancer and in antigen presentation. *Adv Cancer Res.* 62():153-77.
- Subjeck JR, Shyy TT. (1986). Review Stress protein systems of mammalian cells. *Am J Physiol.* 250(1 Pt 1):C1-17.
- Swift RG, Sadler DB, Swift M. (1990). Psychiatric findings in Wolfram syndrome homozygotes. *Lancet* 336(8716):667-669.
- Zatyka M, Ricketts C da Silva Xavier G et al. (2008). Sodiumpotassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet.* 17(2): 190–200.
- Zhuo M. (2009). Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol Brain;* 2:4.
- Takeda K., Inoue H., Tanizawa Y., Matsuzaki Y., Oba J., Watanabe Y., Shinoda K., Oka Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to

endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.*, 10 pp. 477–484.

Takei, D., Ishihara, H., Yamaguchi, S., Yamada, T., Tamura, A., Katagiri, H., Maruyama, Y. and Oka, Y. (2006). WFS1 protein modulates the free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 580(24): 5635–5640.

Tymianski M., Charlton M. P., Carlen P. L. and Tator C. H. (1993). Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* 13: 2085–2104.

Van PN, Peter F, Söling HD. (1989). Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J Biol Chem.* 264(29):17494-501.

Wanderling S, Simen BB, Ostrovsky O, Ahmed NT, Vogen SM, Gidalevitz T, Argon Y. (2007). GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol Biol Cell.* 18(10):3764-75.

Wang JF, Bown C, Young LT. (1999). Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol.* 55(3):521-7.

Wang, H. & Storm. (2003). Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *D. R. Mol. Pharmacol.* 63, 463–468.

Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. (2004). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev.* 25:177–204.

Wiederkehr, A. & Wollheim. (2011). Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic β -cell. *C. B. Mol. Cell. Endocrinol.* 353, 128–137.

Willoughby Debbie and Cooper Dermot M. F.. (2007). Organization and Ca^{2+} Regulation of Adenylyl Cyclases in cAMP Microdomains. *Physiol Rev.* 87(3):965-1010.

Willoughby Debbie, Masada Nanako, Wachten Sebastian, Pagano Mario, Halls Michelle L., Everett Katy L., Ciruela Antonio, and Cooper Dermot M. F. (2010). AKAP79/150 Interacts with AC8 and Regulates Ca^{2+} -dependent cAMP Synthesis in Pancreatic and Neuronal Systems. *J Biol Chem.* 285(26): 20328–20342.

Wolfram DJ, Wagener HP. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc.* 13: 715–718.

Yamada T, Ishihara H, Tamura A et al. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet.* 15 (10): 1600–1609.

Yamaguchi S, Ishihara H, Tamura A et al. (2004). Endoplasmic reticulum stress and N-glycosylation modulate expression of WFS1 protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 325(1): 250–256.

Yoshida H, Haze K, Yanagi H et al. (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 273 (50): 33741 – 33749.

Raamatud

Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White. (2007). *Neuroscience*, Fourth Edition. p. 129-133. Sinauer Associates, Inc.

Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Truu (sünnikuupäev: 23.06.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, „*Wfs1* ja *Grp94* ekspressiooni sõltuvus glükoosi tasemest ja NMDA retseptori aktiivsusest hiire (*Mus musculus*) hipokampuses“, mille juhendajad on Triin Tekko ja Kersti Lilleväli,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013